

CLIPPEDIMAGE= JP402295496A

PAT-NO: JP402295496A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 02295496 A

TITLE: EXAMINATION

PUBN-DATE: December 6, 1990

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
GARMAN, ANDREW JOHN	N/A
MOORE, ROBERT STANLEY	N/A

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
IMPERIAL CHEM IND PLC <ICI>	N/A

APPL-NO: JP02028127

APPL-DATE: February 7, 1990

INT-CL (IPC): C12Q001/68;G01N021/78 ;G01N033/58

US-CL-CURRENT: 435/6

ABSTRACT:

PURPOSE: To enable a target nucleic acid to be detected in a homogeneous solution phase by bringing a sample nucleic acid into contact with a fluorescent nucleotide probe in the homogeneous solution and detecting the presence or absence of the hybridization of both thereof by fluorescent polarization.

CONSTITUTION: A sample is brought into contact with (i) a complementary polynucleotide capable of hybridizing with a target nucleotide sequence and (ii) a fluorescent polynucleotide probe capable of hybridizing with the same region on the complementary polynucleotide, and detecting the presence or absence of the hybridization of the fluorescent polynucleotide probe with the complementary polynucleotide by fluorescent polarization.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-295496

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)12月6日

C 12 Q 1/68  
G 01 N 21/78  
33/58A 6807-4B  
C 7055-2G  
A 7055-2G

審査請求 未請求 請求項の数 23 (全23頁)

## ⑮ 発明の名称 検定方法

⑯ 特 願 平2-28127

⑰ 出 願 平2(1990)2月7日

優先権主張 ⑱1989年2月7日⑲イギリス(GB)⑳8902689.2

⑳ 発 明 者 アンドリュー・ジョー イギリス国シーエイチ3・8ディーイー, チェスター, ア  
ン・ガーマン ストン, ビール・ホール・レーン 15

㉑ 発 明 者 ロバート・スタンレー・ムーア イギリス国シーダブリュー9・6ビーズイー, コンバーバ  
ック, リーズミア・ウオーク 12

㉒ 出 願 人 インベリアル・ケミカル・インダストリー イギリス国ロンドン市エスダブリュー1ビー・3ジェイエ  
フ, ミルバンク, インベリアル・ケミカル・ハウス(番地  
ズ・ビーエルシー なし)

㉓ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名

## 明 細 書

## 1. [ 発 明 の 名 称 ]

## 検 定 方 法

## 2. [ 特 許 請 求 の 範 囲 ]

1. 試料核酸を均質溶液中で標的核酸配列とハイブリダイゼーションできる蛍光ヌクレオチドプローブと接触させ、蛍光偏光によりそのようなハイブリダイゼーションの有無を検出することを特徴とする試料中の標的核酸配列の検出方法。

2. 標的核酸配列に隣接する領域にハイブリダイズする2以上の蛍光標識プローブを使用する特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 標的核酸配列に相補的な試料核酸鎖のアニーリングを防ぐため試料標的核酸鎖に1以上の阻害ポリヌクレオチドがハイブリダイズされる特許請求の範囲第1項または第2項記載の方法。

4. 試料を均質溶液中で(i)標的ヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションできる相補ポリヌクレオチドおよび(ii)この相補ポリヌクレオチド上の同じ領域にハイブリダイゼーションできる蛍光ポ

リヌクレオチドプローブと接触させ、蛍光偏光により蛍光ポリヌクレオチドプローブと相補ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションの有無を検出することを特徴とする試料中の標的核酸配列の検出方法。

5. 標的核酸配列が試料核酸増幅の生成物である特許請求の範囲第1-4項のいずれか1項に記載の方法。

6. 試料核酸増幅により誘導される標的核酸配列が本質的に一本鎖DNAである特許請求の範囲第5項記載の方法。

7. 蛍光偏光により検出されるハイブリダイズした種が標的核酸配列へハイブリダイズした1以上の高分子-ポリヌクレオチド抱合体を含んでいる特許請求の範囲第1-3, 5および6項のうちのいずれか1項に記載の方法。

8. 1以上の高分子が相補ポリヌクレオチドへ結合している特許請求の範囲第4-6項のいずれか1項に記載の方法。

9. 高分子が共有結合的に結合されている特許

請求の範囲第7項または第8項に記載の方法。

1 0. 1以上の高分子が標的核酸配列に結合されている、特許請求の範囲第1-3項のいずれか1項に従属している、特許請求の範囲第5項または第6項に記載の方法。

1 1. 増幅前または増幅中に特異的結合物質が標的核酸配列内へ取り込まれ、増幅後に相補的特異的結合物質-高分子抱合体と接触せられる特許請求の範囲第10項記載の方法。

1 2. 試料核酸を標的配列とハイブリダイゼーションできる蛍光ポリヌクレオチドプライマーと接触させ、生成したハイブリッドをプライマー伸長にかけ、蛍光偏光によりプライマー伸長生成物の有無を検出することを特徴とする試料中の標的核酸配列の検出方法。

1 3. 第1の蛍光ポリヌクレオチドプライマーが第2のポリヌクレオチドプライマーより低い濃度で用いられるポリメラーゼ増殖法を含む特許請求の範囲第12項記載の方法。

1 4. 第2のポリヌクレオチドプライマーが方法。

2 0. 標的核酸配列の定量的検定として実施される特許請求の範囲第1-19項のいずれか1項に記載の方法。

2 1. 異なった蛍光発色団を持つポリヌクレオチドを用いて2以上の標的核酸配列が検定される特許請求の範囲第1-20項のいずれか1項に記載の方法。

2 2. 蛍光発色団がフルオレセインまたはローダミンである特許請求の範囲第1-21項のいずれか1項に記載の方法。

2 3. 適切に緩衝化されたプローブおよび/またはプライマーおよび/または相補ポリヌクレオチド、他の任意の試薬、試料核酸を前処理するための他の任意の溶液、他の任意の緩衝溶液、これらを入れる適切な容器および特許請求の範囲第1-22項のいずれか1項で請求された方法を実施するための指導書からなる検定キット。

3. [ 発明の詳細な説明 ]

産業上の利用分野

1 0-1 0 0倍過剰に存在する特許請求の範囲第13項記載の方法。

1 5. 2つのポリヌクレオチドプライマーが用いられ、各々は試料核酸の反対の鎖を合成開始し、および両方のプライマーは増幅生成物内に取り込まれ、しかも一方のプライマーは蛍光発色団で標識され、高分子が他方のプライマーに結合されている特許請求の範囲第12-14項のいずれか1項に記載の方法。

1 6. 増幅後高分子が特異的結合物質によってプライマーに非共有結合的に結合される特許請求の範囲第15項記載の方法。

1 7. 特異的結合物質が(i)ビオチンおよび(ii)アビジンまたはストレプトアビジンである特許請求の範囲第11項または第16項に記載の方法。

1 8. 試料が生物試料である特許請求の範囲第1-17項のいずれか1項に記載の方法。

1 9. 標的核酸配列が遺伝的疾患、障害または素質を表わす遺伝子座位の対立遺伝子である特許請求の範囲第1-18項のいずれか1項に記載の

本発明は核酸配列の検出の新規の方法に関し、特に蛍光標識核酸プローブに関する。

#### 従来の技術

核酸配列を検出するために現在利用可能な方法は比較的多数の工程を含み実施するのに面倒である。よく確立された方法のいくつかは例えばB.D. HamesおよびS.J.Higgins(編)による「ハイブリダイゼーション(Hybridisation)」IRL出版1985およびJ.A.Mattewsら「アナリティカルバイオケミストリー(Analytical Biochemistry)」, 169, 1988, 1-25(アカデミック出版)に記載されている。典型的には検定されるDNAは変性され、固体支持体(例えばニトロセルロースまたはナイロン)上に結合され、標的と相補的なプローブ配列(例えば<sup>32</sup>Pのごとき標識または例えばビオチンのごときアフィニティー対の一半分を含む)とインキュベートする。インキュベーション後固体を洗浄し、<sup>32</sup>Pに対してはオートラジオグラフィーにより、またはビオチンの場合はアビジン-酵素抱合体を

添加し、更に洗浄し、基質を加えて信号を発生させる。またサンドイッチ検定も知られており、それによると標的に相補的な配列である捕捉核酸プローブは都合のよい固体支持体に結合されている。これは続いて標的配列とハイブリダイズさせる。標識プローブは次に標的配列の別の部分にハイブリダイズさせ、洗浄工程後、標識を適当に発現させる。もしくは、溶液中で2つのプローブと「サンドイッチ」が形成され、1つが標識を含み他のものがアフィニティー対の一半分を含んでいる。ハイブリダイゼーション後、溶液をアフィニティー対の他の一半分が結合している固体相と接触させる。洗浄および信号発生を行う。すべてのこれらの方法およびその変法は多くの取扱い工程、インキュベーション、洗浄等を必要とし面倒で時間がかかる過程を結果として生じる。

K.Kleppeらは「ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー(J.Mol.Biol.)」(1971), 56, 341-361において所望のDNA配列の増幅のための方法を記載している。この方法はDNA

のバンドの存在を増殖反応で使用された特定のプライマーにより決定されたような本来のDNA試料中の配列の存在の証拠として採用される。再び、それらの方法は比較的時間がかり面倒である。

#### 発明が解決しようとする課題

それ故、先に述べた問題点の少くとも一部でも改善する核酸配列の検出のための方法を提供することが望まれている。本発明は標的核酸配列への蛍光核酸プローブのハイブリダイゼーション、または伸長鎖内への蛍光核酸プローブの拡張が蛍光偏光により検出される事および有益な診断検定がこの原理を用いて考案されたという発見に基づいている。

#### 課題を解決するための手段

蛍光標識は生体分子のある範囲の検定に使用されてきた。特に有益な蛍光検定の様式にはDandlikerおよびFeigenにより「バイオケミストリーアンドバイオフィジックスリサーチコミュニケーション(Biochem.Biophys.Res.Comm.)」5, 299-304(1961)に記載されてい

二連体が単鎖を形成する変性過程を含んでいる。変性工程は、冷却により所望のDNA配列に隣接する領域にハイブリダイズする十分に大過剰の2つの核酸プライマーの存在下実施される。そのようにして2つの構造体を得、各々は適切にプライマーと複合体形成した完全長の鋳型鎖を含んでいる。DNAポリメラーゼおよび十分量の各々の必要とされるデオキシヌクレオシド三リン酸を加え、それにより本来の二連体の2つの分子が得られる。変性、プライマーアニーリングおよび伸長の上記のサイクルを所望のDNA配列が適当なコピー数得られるまで繰り返す。プライマー濃度の調整が必要とされるであろう事が示されている。上記方法は現在ポリメラーゼ増殖法(polymerase chain reaction: PCR)と称されており、例えば欧州特許出願公開第0210184号に記載されている。例えばPCRにより生成されたDNA配列のごとき増幅された核酸配列を検出する方法は先に概略した通りである。もしくは、それらはゲル電気泳動により分析でき、与えられた分子量

るときに蛍光偏光の使用が含まれている。この免疫検定においては特異的抗体に対し分析物分子(analyte molecule)と競合する蛍光ラベル分析物分子が提供される。抗体に対する結合の程度は蛍光偏光(fluorescence polarisation)の測定により決定され、与えられた条件下与えられた蛍光発色団(fluorophore)による強度はその量または蛍光発色団が結合している種のおよその分子量に依存している。それ故この方法は抗体-結合および遊離蛍光発色団を区別することができる。簡単に説明すると、試料の蛍光偏光は試料を偏光で刺激し、放射された光の偏光を測定することにより測定される。大きなゆっくりとタンブリングしている分子は光子の吸収および放射の間の動きがより少ないであろうから放射光は高い度合いの偏光を示すであろう。反対に、より小さな分子はより低い程度の偏光を示すであろう(「蛍光分光法の原理(Principles of Fluorescence Spectroscopy)」J.E.Lakowicz, 1983, プレナムを参照されたい)。この型の免

疫検定の原理的利点は、それが均一系である点即ち、分離工程を含まない点である。しかしながら、蛍光偏光免疫検定技術は低分子量分析物、即ち、薬剤およびチロキシンのとき低分子量のホルモンのとき約1,000未満の分子量を持つ分析物に制限されてきた。核酸配列に対する類似の検定は一本鎖または二本鎖標準核酸を有用な配列特異性で認識する抗体が知られていないために容易に考案されなかった。

本発明の方法は分子生物学研究および診断医学のすべての領域および例えば特定の核酸配列を検出または測定する必要がある法医学、農学、獣医学または食品科学のとき他の診断科学 (diagnostic sciences) に応用できる。特に、感染性微生物の検出および種々の遺伝疾患および素質を起こす点突然変異、遺伝子欠失および再配列の検出に応用できる。本発明の方法の更なる応用は例えば「ヌクレックアシズリサーチ (Nucleic Acids Research)」14, 5591-5603 (1986) または「バイオテクノロジー (Biotechnology)」

6巻, 1197-1202ページ (1988, 10月) に記載されているときQ $\beta$ レプリカーゼにより発生されるようなRNA配列のような検定シグナル系の一部として核酸自身が発生される核酸の検定に使用されることであろう。本発明の方法の特に都合のよい使用法は、先に記載したポリメラーゼ増殖法 (PCR) により発生されたDNA配列の検定に対するものである。本発明の方法の更に都合のよい使用法はPCT特許出願公開W088/10315に記載されているシスカディアグノスティックス社 (Siska Diagnostics Inc.) の転写に基づく核酸増幅/検定システムおよびバイオテクニカインターナショナル (Biotechnica International) (EP-320308) のリガーゼ開始増幅システムに関連したものである。

本発明の方法の特別な利点はそれが均一相で (例えば溶液相) 実施されるであろう事である。一般的にこの事は試料DNAへポリヌクレオチドプローブのとき1つまたはそれより多くのポリヌクレオチド種を含む試薬を単に添加する事のみ

が必要とされることを意味し、その結果時間と労力の節約になる。一般に、一回のインキュベーションのみが含まれ、分離、洗浄および電気泳動工程が避けられる。

本発明の第一の態様に従うと試料中の標的核酸を検出する方法が提供され、その方法は試料核酸と均一溶液中標的核酸配列とハイブリダイゼーションできる蛍光ヌクレオチドプローブを接触させ、そのようなハイブリダイゼーションの有無を蛍光偏光により検出することからなる。

試料は一般的には生物起源であり、例えばヒト、植物および/または動物から得られる。標的核酸は一般的には原核および/または真核生物核酸またはその増幅生成物である。本発明の好都合な態様にはヒトDNA配列のときヒトまたは動物DNAの検出が含まれている。

本発明の方法に使用されたポリヌクレオチドプローブにはDNA、RNAまたは核酸配列とハイブリダイズできる任意の種類のポリヌクレオチドが含まれる。そのような核酸配列には天然に存在

する塩基シトシン、アデニン、グアニン、チミンおよびウラシル同様に塩基類似体も含まれるであろうことが理解されるであろう。そのような塩基類似体にはヒポキサンテン、2,6-ジアミノプリンおよび8-アザグアニンが含まれる。プローブは二本鎖(ds)でも一本鎖(ss)の形でよいが好適には一本鎖の形である。それらは直接合成、ポリメラーゼ開始伸長反応またはクローニングまたは他の都合の良い方法により調製されるであろう。これらのヌクレオチドプローブは以下に記載されるごとく蛍光的に標識される。

ここで使用される表現「ハイブリダイゼーション」とはポリヌクレオチドプローブおよび所望の標的配列間のハイブリダイゼーションを含むが、ポリヌクレオチドプローブおよび望まれないヌクレオチド配列間のハイブリダイゼーションは含まれない。ハイブリダイゼーションに適した条件は当業者にはよく知られている。例えば「核酸ハイブリダイゼーション (Nucleic Acid Hybridisation)」B.D.JamesおよびS.J.Higgins (編、

IRL出版社、オックスフォード、1985を参照されたい。一般に、測定に先立って都合のよい時間内にかなりの程度のハイブリダイゼーションが起こるように蛍光プローブが標的核酸に付けられる。ハイブリダイゼーションに好都合の温度は室温(典型的には20から25℃)であるが、同様にプローブおよび標的核酸の融点以下の他の温度も含まれる。反応緩衝液のpHは一般に中性または中程度のアルカリ性であり(例えばpH 7.5から9.0)、所望のハイブリダイゼーションは起こるが他の配列との望まれないハイブリダイゼーションが排除されるようにイオン強度が選択される。上に記載した変動できる値の効果は文献によく知られている。例えば「核酸ハイブリダイゼーション」、B.D.JamesおよびS.J.Higgins(編)、IRL出版社、オックスフォード、1985。

プローブの区別能力は一般に標的ヌクレオチド配列との相同性を100%とすることにより最大にできるが、そのことは必須ではなく、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%、

例えば百万倍)は6-20塩基長(例えば8-15塩基)ポリヌクレオチドプローブを用い選択性を落とすことなしに検出されるであろう。通常上記条件は30塩基長未満の、より好適には20塩基長未満のポリヌクレオチドの場合である。ポリヌクレオチドプローブの長さは標的配列への結合により測定可能な分子量の増加が起こるように都合よく選択される。一般的に少なくとも分子量が2倍に増加するように選択されるが、最大の感度および信頼性のためにはより大きな増加が望ましい。

蛍光偏光とは偏光により励起されたポリヌクレオチドプローブに含まれる蛍光発色団から放射された光の偏光の分析を特徴とするすべての分析法が含まれる。特に平面偏光で励起された場合に蛍光発色団から放射される光の分析を含んでいる。例えばこのことはM.E.Jolleyの論文に概説されている(「ジャーナルオブアナリティカルトキシコロジー(J.Analytical Toxicology)」, 5, 236-240ページ, (1981))。

均質な溶液とは液体相中に溶質を含む任意の溶

好適には少なくとも95%のごとき任意の都合のよい程度の相同性が選択され、所望のハイブリダイゼーションのみが用いられたハイブリダイゼーション条件下起こる。ポリヌクレオチドプローブの長さは選択されたハイブリダイゼーションの特異性要求度に依存するであろうし、標的核酸の分子量に従ってもまた選択される。例えば一般的に上記の本発明の方法を用いたヒトゲノムDNA配列の検出には少なくとも17塩基のポリヌクレオチドプローブが受け入れられる程度の特異性を達成するのに必要とされる。(Wallaceら「プロシーディングスオブザナショナルアカデミーオブサイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.)」, 80, 278, 1983)。ポリヌクレオチドプローブの長さの上限は合成の都合により決定され、それは一般に約100塩基である。通常長さは10-40塩基の範囲であろう。しかしながら、例えばPCR反応により増幅された配列もまたより短いポリヌクレオチドプローブを用い感度を減じることなく検出できる。例えば、増幅されたヒト遺伝子配列(例

液を含む。これにはまた蛍光偏光測定ができる十分に透明または非散乱性の微細な懸濁液またはコロイドまたは関連する混合物も含まれている。

蛍光プローブの濃度は最も低い予想の標的濃度とほぼ等しいかまたはそれ以下になるように都合よく選択され、即ちプローブは標的より大過剰には供給されない。ハイブリダイズされない蛍光プローブは引き続き低い偏光を与え、ハイブリッドの高い偏光を検出するのがより困難になるであろう事より、特に、混合物中の種の偏光は加成性がなく、観測される偏光は最も低い偏光の種により最も強く影響されるので上記のことが望まれる。標的試料核酸濃度の範囲が容易に予測できないような検定においては、使用される蛍光プローブの濃度が検定の感度を實際上決定するであろうことが理解されるであろう。標的核酸配列が例えばポリメラーゼ増殖法(PCR)のごとき増幅工程により発生されている場合、増幅核酸の量が一般に一定になるように都合よく増幅が実施され、計算または適当な常用実験により蛍光プローブの適し

た値が容易に選択される。

先に記載したごとく本発明の方法の特に好都合な使用法はポリメラーゼ増殖法(PCR)により発生されたDNA配列の検定である。それ故本発明の以後の態様においては標的核酸配列とは、例えば試料DNA増幅のごとき試料核酸増幅法の生成物のことである。

核酸ハイブリダイゼーションの共通の特徴は試料核酸鎖の分離するために変性後、問題とする試料核酸配列と相補的な試料核酸鎖が問題とする配列とのハイブリダイゼーションにおいて蛍光プローブと拮抗する事である。もし、蛍光プローブが相補的鎖により置き換えられるとハイブリダイゼーションは起こらないであろうし、起こったとしても受け入れられない程度の感度でのみであろう。ポリメラーゼ増殖法(PCR)に関しては、この問題は以下の態様を応用することにより排除または少くとも軽減されるであろう。

比較的短いPCR生成物(好都合であるのは100塩基対未満の長さのもの)が標的ヌクレオ

チドに対し過剰の第1のプライマーでPCR反応を実施する。それ故、等しくない濃度の2つのプライマーを増幅反応に使用することにより相補鎖より過剰の1つのポリヌクレオチド鎖を発生する事が可能である。例えば、100ピコモルの第1のプライマーおよび2ピコモルの第2のプライマーを標的ヌクレオチドと組合せて用いる標準100μL PCR反応は第1のプライマーにより発生された過剰の鎖を産生するであろうし、それは蛍光プローブを用いて検出できる(例えば本発明の直接プローブアプローチを用いて)。

本発明の方法の更なる態様においてはポリヌクレオチドプローブの添加前または同時に、鎖置換を防ぐために都合よく阻害核酸から添加されるであろう。阻害ヌクレオチド配列はプローブにより認識される標的配列に隣接する領域(1つまたは両方の部位)に結合する。都合のよいのは10-100塩基長(好適であるのは20-50塩基長)の合成オリゴヌクレオチドであるこれらの阻害核酸は都合よくプローブ自身より高い濃度で用いら

れた配列を含むポリヌクレオチドとして使用されるであろう。そのような例においては、標的鎖として選択されたものに相補的な鎖はプローブ配列より有意に大きくなくそれにより競合が少なくなる。例えば80塩基対のPCR生成物(20塩基対離れた2つの30merプライマー(primer)により発生された)は間にはいった20塩基対部分中の1つの配列に相補的な16-merにより検出される。

本質的に一本鎖生成物を発生することができる核酸増幅過程のある種の方法は上記の方法に特に適しており、先に示した置換の問題が軽減される。例えばGyllensten V.B. らによりP.N.A.S., 1988, 85, 7652に記載された非対称ポリメラーゼ増殖法(PCR)または例えばHiguchi R.G. らにより「ヌクレイックアシスズリサーチ」, 1989, 17, 5865に記載されているエキソヌクレアーゼ処理を伴うPCR。

好適な非対称法では、典型的には10-100nMの通常より低い濃度で存在する第2のプライマー

れ、それにより相補鎖と拮抗し、標的へのポリヌクレオチドプローブの結合を可能にする。上記の事情は便宜上以下のごとく図示される:

相 補 鎖 : 3'.....5'  
阻害配列/プローブ: 3'.....5' 3'.....5' 3'.....5'  
標 的 鎖 : 5'.....3'

本発明の更なる態様はお互いを相互に阻害し、それにより相補鎖の結合を阻害するための1つ以上のポリヌクレオチドプローブの使用を含んでいる。この構成は蛍光偏光測定を精度を増加させることにより感度を改良できる。この実施態様は便宜上下記のごとく図示される:

プローブ プローブ プローブ  
ポリヌクレオチド: 3'.....5' 3'.....5' 3'.....5'  
プローブ  
標 的 鎖 : 5'.....3'

使用される阻害核酸およびポリヌクレオチドプローブの正確な数は標的鎖の長さ、その塩基組成等のごとき多数の因子に依存し、至適数は例えば適当な実験から当業者により容易に決定されるで

あろう。

本発明の前記の態様は便宜上、以後直接プローブ法(direct probe approach)と称する。

本発明の更なる態様において試料中の標的核酸配列の検出法を提供し、その方法は試料を(II)標的ヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションできる相補的ポリヌクレオチドおよび(III)相補ポリヌクレオチド上の同一領域にハイブリダイゼーションできる蛍光ポリヌクレオチドプローブと均質溶液中接触させ、蛍光ポリヌクレオチドプローブと相補ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションの有無を蛍光偏光により検出する。

この態様において標的核酸配列および蛍光プローブは相補ポリヌクレオチドの同一領域に対し拮抗する。この態様はそれ故拮抗ハイブリダイゼーション検定である。前に説明したごとく、ヌクレオチド配列およびハイブリダイゼーション条件は望まれないヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションを排除するように選択される。

一般に相補的ポリヌクレオチドはDNAまたは

な取り込みまたは天然に存在しない塩基類似体の使用により低くすることができる。都合のよい長さ、蛍光プローブおよび相補的ポリヌクレオチドの間の配列は当業者により容易に決定されるであろう。好適には相補的ポリヌクレオチドの長さは蛍光発色団が結合している種の分子量により大きな変化を与え、従って偏光の変化がより検出し易くなるように蛍光プローブよりも長いであろう。相補的ポリヌクレオチドの長さの上限は一般に都合により決定されるが、例えば合成オリゴヌクレオチドの場合には100塩基未満である。

上記拮抗ハイブリダイゼーション検定において試薬添加の順序および時期は当業者により決定されるであろう。一般的には蛍光プローブは最初に試料と、続いて相補的ポリヌクレオチドと接触させる。

本発明の別態様に従って検定される標的核酸配列は直接プローブ法に関して前に示した都合のよいまたは好適な態様にも従う。

本発明の上記の態様は以後便宜上拮抗ハイブリ

DNAのごとき二本鎖または一本鎖核酸種を含み、好適であるのは例えば一本鎖DNAのごとき一本鎖核酸種である。相補的ポリヌクレオチドは好適には合成オリゴヌクレオチドである。相補ポリヌクレオチドの都合のよい長さは少なくとも15塩基であり、好適には少なくとも30塩基である。

試薬の濃度は問題とする標的核酸が試料中に不在であれば蛍光プローブは相補ポリヌクレオチドに結合するように、一方標的核酸配列の存在下では蛍光プローブが置換されるか結合せずに残存するように調整する。後者の場合蛍光発色団はより小さい分子量種に結合されているので、より低い蛍光偏光値が観察される。検定は蛍光プローブと相補的ポリヌクレオチド間の親和性が問題とする標的核酸配列と相補的ポリヌクレオチド間の親和性より低くなるように設計されるであろう。この親和性は蛍光プローブおよび相補的ポリヌクレオチドの長さの賢明な選択により調整されるであろう。もしくは、蛍光プローブおよび相補的ポリヌクレオチド間の親和性は1つまたは少数の不適正

ダイゼーション検定法(competitive hybridisation assay approach)と称する。

変性後の二本鎖核酸標的の場合、蛍光プローブは試料DNA鎖の1つと結合し、高偏光値を生じ、それ故問題とする試料核酸配列の不在を誤って示唆する。それ故本発明の方法の好適な態様は、種々の増幅過程および上に記載したその変法により容易に発生されたもののごとき、実質的に一本鎖核酸の検出である。

本発明はまた蛍光核酸プライマーの伸長鎖への取り込み、続いての蛍光偏光による伸長鎖の存在の有無の検出に関する。

本発明の更なる態様に従うと試料中の標的核酸配列の検出のための方法が提供され、それは試料核酸を標的配列とハイブリダイゼーションできる蛍光ポリヌクレオチドプライマーと接触させ、形成したハイブリッドをプライマー伸長反応(primer extension)にかけ、蛍光偏光によりプライマー伸長生成物の存在の有無を検出する。

プライマー伸長は一般的に酵素的に達成され、



続いて、例えば鎖分離、更なるポリヌクレオチドプライマーのアニーリングおよびその酵素的伸長を行なうことができる。上記の処理手続は望ましい回数だけ反復することができる。上記の各工程および2つのプライマーを用いる両方の鎖を複製する方法は、例えば、K.Kleppeらによる「ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー (J.Mol. Biol.)」, (1971) 56, 341-361 に記載されている所望のDNA配列の増幅のための方法であり、欧州特許出願公開第0201184号にポリメラーゼ増殖法として示されている。蛍光偏光を用いるプライマー取込みの有無の検出は上に概説した任意の段階で達成できるが、最も都合が良いのは上記処理手続の完了後であろう。蛍光核酸プライマーは用いられるポリメラーゼ酵素による認識をいかなる程度も誤じないように選択されることを理解されたい。上記の方法は例えば2つの蛍光プライマーまたはより好都合には1つの蛍光プライマーおよび1つの非蛍光プライマーで実施されるであろう。

分間)のポリメラーゼ伸長工程が含まれている。これらの工程を15-50回の間(典型的反応では15および40回の間)繰り返す。

通常のPCR反応においてはすべてのプライマーが消費される前に増幅反応が完了することが知られている。上に説明した本発明のPCR様態ではそれ故通常かなり過剰存在するであろう低分子量蛍光プライマーの存在下高分子量蛍光伸長生成物を検出する必要がある。これにより蛍光偏光測定感度および精度に対しては非常に注意しなければならない。一つの解決法はクロマトグラフィーまたは電気泳動により蛍光PCR生成物を分離することであるがそれは時間がかかり好適ではない。好適な方法は、通常より低い濃度(典型的には10-100 nM)で存在する第2の蛍光プライマーに対し過剰の第1の非蛍光プライマーとPCR反応を実施することである。そのためすべてのまたはほとんどの蛍光プライマーが伸長されそのため偏光値が増加する。例えば、100ピコモルの第1のプライマーおよび2ピコモルの第2

ポリメラーゼ増殖法の実施の為の好都合は条件は例えば1  $\mu$ g またはそれ以下の試料DNAを使用し、それは典型的には1 mM 濃度のdATP, dCTP, dGTP および dTTP を含む例えば pH 7.2-8.8 の典型的には50-150  $\mu$ l の緩衝液と混合される。特異的プライマーオリゴヌクレオチドが添加される(1 nM-2  $\mu$ M)。これらのプライマーは典型的には15から40ヌクレオチド長でその配列は両鎖の5' 末端に対応している。上記混合物を加熱により(典型的には90-100度Cに、例えば100度Cで1-10分間)充分に変性させる。50度C以下に冷却後、典型的には0.5-5単位の例えばテルムスアクアテクス (Thermus aquaticus)からのDNAポリメラーゼのごとき熱安定性ポリメラーゼを添加する。増幅は一連の熱サイクルにより達成され、それには85-95度Cで1/2から3分間の変性工程、40-65度Cでまた1/2から3分間の任意のアニーリング工程および60-80度Cで問題とする配列に至適であった時間(典型的には5秒から3

の蛍光プライマーを使用する標準100  $\mu$ l PCR反応においては蛍光プライマーの実質的完全な取り込みが確められた。

本発明の検出法は都合よく、C.R.Newtonらによる「ヌクレイックアシズリサーチ」, 1989, 17, 7, 2503-2516に記載され、欧州特許公開第332435号(ICI)に特許請求されているアンプリフィケーションリフラクトリーミューテーションシステム(Amplification Refractory Mutation System: ARMS)と連結して実施される。簡単に、本方法は(1)標的塩基配列の診断部分(diagnostic portion)に対し実質的に相補的な診断プライマーを核酸試料と接触させ、それにより、適当な条件下標的鎖型上の診断部分の伸長が診断プライマーの末端ヌクレオチドが疑われる変異体のヌクレオチドかまたは標的塩基配列の対応する正常ヌクレオチドと相補的である場合のみ達成され、および(2)伸長生成物の存在の有無を検出する。ARMSはそれ故本発明の直接プローブ法に従った増幅生成物の有無を検

出するための蛍光プローブ(単一又は複数)を用いて、または適当な蛍光プライマー(単一又は複数)を用いて前記の拮抗ハイブリダイゼーション法によるプライマー伸長物の有無を検出することにより実施することができる。

本発明のすべての診断方法は興味ある多数の異なった核酸配列を一回の試験で検出するために使用できる。このことは異なった蛍光発色団を使用することにより準備され、各々の蛍光発色団は特定の配列の存在が示されている。単一の検定で検出可能な配列の数は本質的には適した蛍光発色団の数でのみ制限され、例えば異なった分光学的性質を持つ(特に異なった励起および/または放射波長)ものは同定でき、ポリヌクレオチドプローブ内へ取り込ますことができる。

興味を引く他の核酸配列は例えば遺伝子座位の対立遺伝子である。これは例えば点突然変異、転座(translocation)、または欠失により起こされる遺伝的疾患の検出に特に重要であり、一般に正常および突然変異対立遺伝子の個々からの試

料(1073)、正常配列にハイブリダイズするプローブを用いた決定および突然変異配列にハイブリダイズするプローブを用いて決定する試験が行われる。3つの可能な成果から結果を得る:

	N/N	N/M	M/M
正常プローブ	+	+	-
突然変異プローブ	-	+	+

(ここでNおよびMは正常および突然変異対立遺伝子を示し、"+"は偏光値が増加したことを示す)

上記の診断試験には2つの別々の検出が含まれている。本発明の好適な態様においては2つまたはそれ以上の標的核酸配列に対する試験が単一の反応容器中で実施される。これは、各々の対立遺伝子特異性核酸プローブを異なった蛍光発色団で標識し、プローブを標的核酸と接触させ、例えば励起波長および光が測定される波長の必要な変化をさせることができる装置を用いて各々の蛍光発色団の蛍光の偏光を決定することにより達成される。核酸が増幅反応の生成物の場合、随意に、増幅反

料DNAを単一の試験で検出できるのである。

それ故、本発明の更なる態様に従うと、標的核酸配列は遺伝的疾患、障害または素質を示す遺伝子座位の対立遺伝子に対応する。

標的核酸配列の存在の有無の検出は例えば前記のアンプリフィケーションリフラクトリーメーションシステム(ARMS)を用いて都合よく達成される。もしくは、本発明の直接プローブ法に従った対立遺伝子特異的蛍光核酸プローブとのハイブリダイゼーションが用いられ、都合が良いのは試料核酸をポリメラーゼ増幅法により増幅した後である。

遺伝子座位の特定の対立遺伝子に対し患者がホモ接合性であるかまたはヘテロ接合性であるかを決定するのは一般的に興味があるために、典型的には異なった対立遺伝子に特異的なプローブを用いる2つのそのような決定方法が必要とされよう。例えば主突然変異phe 508欠失を用いる嚢胞性線維症(cystic fibrosis)の診断においては(Keremら、「サイエンス」、1989、245、

応が進行したかどうかを試験するためのプローブを使用してもよい。しかしながら先に与えたCF診断例において、増幅反応の一般的失敗は両方のプローブでの低偏光として独特に現れるであろうことを表示している。

本発明の方法は試料中の1つまたはそれ以上の標的細菌またはウイルス核酸配列の存在の有無を検出するのに都合よく使用される。特許請求された方法の更に都合のよい態様は2つまたはそれ以上の異なった細菌またはウイルス株からのDNA配列のごとき核酸配列の単一容器中での検出である。

本発明の前出のすべての態様において蛍光発色団に結合している種の分子量に変化があり、それが蛍光偏光により検出されている。検出方法を高感度、強力におよび妨害を最小にするためこの変化は可能なかぎり大きい方が望ましい。

蛍光偏光により検出されるべきハイブリダイズした核酸は都合良く、検出されるべき分子量の変化を増すため高分子に結合される。高分子に結合するのに使用される実際の手段は使用される特定

の例に依存するであろうし、プローブ標的ハイブリダイゼーションに先立ってまたは続いて行われる。

本発明の方法の実施に不利に働かないように提供される任意の都合のよい高分子が使用できる。タンパク質は都合のよい高分子であり例えば高分子量のタンパク質(例えばウシ血清アルブミン、チログロブリンまたはかぎ穴かさ貝ヘモシアニン)またはデキストランまたはポリアミノ酸のごとき水溶性重合体も使用される。高分子抱合体の分子量はプローブ抱合体の分子量が有意に増加するように都合よく選択され、分子量の好都合な範囲には8000ダルトン以上、1,5000ダルトン以上、30,000ダルトン以上、最も好適には100,000ダルトン以上のごとき3,000ダルトン以上が含まれる。高分子の分子量の上限は粘度および溶解度のごとき物理的パラメータにより一般的に制限される。許容されないほど試料中の光の散乱を引き起こすことがない限り、ナノビーズ類(nanobeads)またはサブミクロンラテックス類(sub-micron

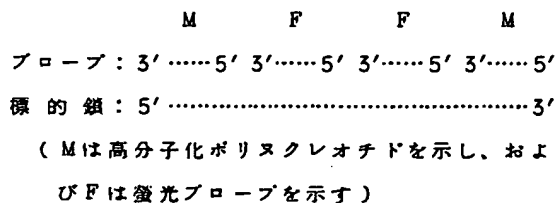
lattices)のごとき不溶性重合体種も適していると思われる。

結合の型は用いられた特定の態様に依存するであろう:

直接プローブ法では試料核酸は1つまたはそれより多くの高分子化されたポリヌクレオチド及び前記の1つまたはそれより多くの蛍光プローブの両方と接触させる。先に概説したごとく高分子化ポリヌクレオチドは一本鎖核酸(好都合なのはオリゴヌクレオチド)と高分子の抱合体を含んでいる。

それ故本発明の更なる態様に従うと、蛍光偏光により検出されるべきハイブリダイズした種は標的核酸配列にハイブリダイズした1つまたはそれより多くの高分子-ポリヌクレオチド抱合体(conjugate)を含んでいる。

下記の図は蛍光プローブおよび高分子化ポリヌクレオチドの1つの可能な配置を示している:



これらの種の最適な配置は例えば日常の実験から当業者により決定されるであろう。

拮抗検定法においては相補的一本鎖標的核酸配列が例えば直接プローブ法に関して前に概説されたごとく高分子へ抱合される。生じる抱合体を前記のごとき拮抗検定に使用する。この結果問題とする試料核酸配列の不在下混合物はより高い偏光を示す。

それ故拮抗検定法の更なる態様においては1つまたはそれより多くの高分子が相補ポリヌクレオチドに結合している。

高分子の取り込みは非共有または共有結合を通して行われる。タンパク質とオリゴヌクレオチドのごとき高分子の共有結合的結合の過程は既知である。例えば欧州特許202758号に記載されて

いる。非タンパク性高分子の結合のための好適な化学は特定の高分子および結合にどんな官能基が利用できるかに依存するであろう。一級アミノ基または容易にアミノ基に誘導できる基を含む高分子はタンパク質のごとき処理でき先に示した方法に基づく過程が使用できるであろう。カルボキシル基またはカルボキシル基に誘導できる基を含む高分子はアミノ-誘導化オリゴヌクレオチドとカルボジイミドまたは活性エステル化学を用いて結合できる。共有結合的結合のために都合がよいポリヌクレオチドは合成オリゴヌクレオチドである。

非共有結合的結合は都合よく特異的結合物質を経て達成され、1つの物質がポリヌクレオチドに結合し、他のものが高分子に結合する。都合のよい特異的結合物質の例は、ビオチンおよびストレプトアビジンまたはアビジン、ハプテンおよび抗ハプテン抗体またはオリゴサッカライドおよび特定のレクチンである。ビオチンおよびストレプトアビジンまたはアビジンは特に好適な特異的結合

物質である。偏光変化の望まれる増加を最大にするため、低分子パートナーのポリヌクレオチドへの結合およびより高い分子量パートナーの高分子への結合が好適である。対のより高い分子量パートナー自身で偏光の変化の望まれる増加を達成するのに十分な分子量であるようないくつかの検定においては更なる高分子への結合は不必要である。ポリヌクレオチドがポリメラーゼ開始プライマー伸長反応 (polymerase-mediated primer extension reaction) により調製された場合非共有結合的結合が都合よく用いられる。ここでは結合パートナーは修飾ヌクレオチド三リン酸を使用して導入される。特異的結合物質間の非共有結合性結合は本発明方法の実施中の都合のよい時間に達成される。検定容器への第2の結合物質の添加は、ハイブリダイゼーション前、ハイブリダイゼーション後またはポリヌクレオチド成分と同時にである。

蛍光プライマー法においてはポリメラーゼ増殖法が実施されるが、その際に、伸長反応が有意に

ービオチニル化プライマーを第2の(非蛍光)プライマーとして用いる。非対称PCR増殖においてはこのプライマーは高濃度で存在する。PCR反応後偏光測定前に高分子抱合物が添加される。ビオチニル化(biotinylated)オリゴヌクレオチドのための方法は既知であり例えば欧州特許202758(ICI)に記載されているごとくまたはカルビオケムコーポレーション(Calbiochem Corporation)のカタログに記載されているアミノ誘導化オリゴヌクレオチドのごとき試薬を使用して行なう。

もしくは1つの結合物質(好適にはより低い分子量成分、例えばビオチン)が一本鎖生成物を与える前記のPCR変法のごとき増幅反応中に取り込まれる。この事は1つまたはそれ以上のビオチニル化プライマー(例えば5'-ビオチニル化プライマー)を使用するかまたはビオチンの最大の取り込みを与えるように日常の実験により選択された濃度で増殖緩衝液に供給したビオチン-[r]-アミノブチル-[ε]-アミドカプロイル-[5

阻害されないようにおよび高分子が安定なように、即ち増殖反応に用いられる温度および他の条件下高分子が変性および沈殿しないような方法で高分子がプライマーに結合されるならば、プライマーの1つが前記のごとく蛍光で標識され、第2のプライマーは例えば前記のごとくして高分子に結合される。それ故高分子はプライマーの3'末端には結合されていず増幅反応下変性を受け易く、沈殿し易いタンパク質は使用しないのが好適である。蛍光プライマー(これは前記のごとく好適には少ない濃度で存在する)の高いパーセント率での取り込みを確実にするため、例えば他のプライマーを10-100倍過剰に存在させる。しかしながらポリメラーゼ増殖反応で用いられる高分子化したプライマーの濃度を下げることは一般に必要ではない。

高分子の非共有結合的結合に関しては、増幅反応後、高分子抱合体を添加するのが好適である。例えばPCR増殖反応は前記のごとく設計できるが、ビオチニル化プライマーに対しては例えば5'

ー(アミドアリル)-2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸(Langer P.R.ら「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス(Proc.Natl.Acad.Sci.)」(1981), 78, 6633)のごときビオチニル化ヌクレオチドの取込みにより達成される。

増幅後、標的DNAの存在は本発明の直接プローブ法により検出され、最初に増幅された標的を高分子抱合体(この例では高分子アビジン抱合体または高分子ストレプトアビジン抱合体)とインキュベートする。この方法は他の結合対(例えばプライマーまたはハプテンで誘導体化したデオキシヌクレオチド三リン酸を用いてもよい)、抗体高分子抱合物を用いる偏光の促進に用いてもよい。

本発明の方法に使用される試料DNA(標的核酸配列を含んでいてもいなくても)はこの分野では既知の常法を用いて前処理される。これらの処理は加熱、強アルカリ性溶液、プロテイナーゼK、適当な界面活性剤での処理のごとき工程を含んでいる。一般には例えば加熱によりプローブの添加

に先立ってDNAを一本鎖にしておくことが望ましいが、それは検定の型に依存するであろう。随意に1つまたはそれより多くの制限酵素を用いて試料DNAを切断するのが評価されるであろう。

都合よく本発明に従って使用されるプローブおよびプライマーは合成オリゴヌクレオチドである。そのようなオリゴヌクレオチドは本分野で既知の方法により容易に合成でき(例えば、「オリゴヌクレオチド合成(Oligonucleotide Synthesis)」M.J.Gait, IRL出版を参照されたい)、標識を付ける(この場合これらのオリゴヌクレオチドに対する蛍光発色団)ための多くの化学が知られている。結合の2つの原理的型がある。第1は適したリンカーを用いるオリゴヌクレオチドの5'かまたは3'末端への結合である。適したリンカーはアミノアルキル基であり(特にアミノヘキシル)それはオリゴヌクレオチド合成の間に容易に5'末端に結合できる。例えばAgrawal S.ら、「ヌクレイックアシックスリサーチ」, 14 (1986), 6227-およびWo-88/02004(出願人:アブ

ライドバイオシステム)を参照されたい。アミノ基は続いてフルオレセインイソチオシアナートのごとき活性化蛍光発色団誘導体と反応させる。もしくは蛍光発色団を塩基部分に結合してもよい。例えば塩基シトシンの環外アミノ基は好都合な結合点である;もしくは塩基部分上の他の原子との色々な他の結合も可能である。例えばRuthら, DNA, (1985), 4, 93およびLetsinger, 「ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー(J. Am Chem Soc)」, (1983), 103, 7394を参照されたい。環アミノ基に結合したアミノアルキル基を含むシトシン誘導体は次に活性化蛍光発色団と反応させる。続いての方法では、例えばH. Inoueらの「ヌクレイックアシックスリサーチ」, 13, 7119(1985)に記載されているごときそれ自身が蛍光性である塩基類似体を使用する。プローブ当り1つの蛍光発色団を結合させるのが都合がよいけれども、高い感度が必要とされるようなある種の環境ではプローブ当り1つ以上の蛍光発色団を結合するのが好都合

である。すべての結合方法の本質的特色は標的核酸配列にハイブリダイズする能力が有意に減じられるべきでない事または蛍光プライマー伸長法においてプライマーの合成開始能力が減じられるべきでない事である。この後者の場合、蛍光発色団の3'結合は一般的に不適当である。

もしくは本発明の方法で使用される蛍光プローブおよびプライマー(特に蛍光プローブ)は標的核酸に対し所望のハイブリダイゼーションを行うことが知られている核酸の一区画またはその相補鎖を調型として用いるポリメラーゼ開始伸長反応により作製される。蛍光発色団で標識されているプライマーを使用して都合よく5'末端に、または蛍光性ヌクレオチド類似体または蛍光発色団が前もって結合してあるヌクレオチド(例えばシトシンの環外アミノ基またはウリジンの5位および所望のハイブリダイゼーションがその後ためにならないように結合されて)の取り込みにより蛍光団が導入されるであろう。

本発明の方法で使用される蛍光発色団は以下の

指針を用いて都合よく選択される:

- 検定に所望の感度を提供するため十分高い量子収量およびモル吸光係数を持つもの。
- 比較的小さな分子量を持つもの、好適には5000未満、より好適には1000未満。
- 検定に使用される分子の回転時間に比敵する蛍光寿命を持つもの。この点はM.E. Jolley, 「ジャーナル・オブ・アナリティカル・トキシコロジー(J. Analyt. Toxicol.)」 5, 236-240, (1981)により詳細に議論されている。
- ポリメラーゼ増幅法に関して、熱安定性でなければならない。
- 好適には強力なインターカレーター(Inter-calator)であってはならない、なぜならそれは試料中プローブの非標的DNAへの非特異的結合を起こし、誤った高偏光読み取り値を与えるからである。

上記指針はフルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、スルホローダミン101、ビレンおよびダンシル(dansyl)のごとき広い

範囲の蛍光発色団を含むが、都合がよいのはフルオレセインおよびローダミン、特にフルオレセインである。

そのような蛍光発色団は例えばイソチオシアナート誘導体、スクシンイミジルエステルまたはスルホニルハライド誘導体を用いて例えばポリヌクレオチドのアミノ基へ、または例えばマレイイミド誘導体を用いてチオールが誘導されているポリヌクレオチドへ都合よく結合されるであろう。例えばモレキュラープローブ社 (Molecular Probes, Inc.) のカタログに示されているような、蛍光発色団の他の反応性誘導体もまた知られている。

検定のハイブリダイゼーションが完了した後、検定では単一偏光決定がなされる。もしくは、生じうるアーティファクト (artefact) を除去するため、検定に先立って蛍光プローブまたはブライマーの偏光も決定しておくのが望ましく、それにより偏光の変化が測定される。それは偏光蛍光光度計、典型的には放射光光路および励起光光路に位置するフィルター、プリズムまたは液晶のご

実際に、対照検定 (controlled assay) においては、核酸配列の存在を示すには偏光の変化は2つの読みのみ (または1つまで) が必要とされる (繰り返しは除く)。

決定は偏光要素を備えた多くの種類の蛍光光度計により実施できる。そのような蛍光光度計は放射光が励起ビームに対し90°である・L・型式またはそれが90°および270°の両方で測定される・T・型式のどちらかであろう。この後者の方位は垂直および水平成分を同時に分析できるように偏光要素を取り付けることを可能にする。感度を改良するため、例えばアルゴンイオンレーザーのごときレーザー光源が使用される。異った蛍光発色団の測定を可能にする為には、回折格子、フィルターを使用するか光源を切替えることによる励起および/または放射波長を変化のための準備がなされるであろう。

散乱光は高度に偏光されており、低蛍光ポリヌクレオチド濃度ではそれが有意な妨害にならないことを保証する注意を払わねばならない。そのよ

うとき偏光要素を備えた蛍光光度計 (例えばJolley J. 「ジャーナルオブアナリティカルトキシコロジー」, 5, 236-249 (1981)) で測定される。本質的には試料が水平 (H) または垂直 (V) に偏光された光で照射された時に放射される水平または垂直に偏光した光を測定する。例えば試料を垂直な光で照射した時の偏光値は次式で与えられる。

$$P = \frac{(I_{11})_V - (I_1)_V}{(I_{11})_V + (I_1)_V}$$

式中11は放射偏光子が垂直に対し平行であり、1は放射偏光子が垂直に対し直角であることを示している。この式は装置のバイアスを入れて次式のごとく補正される:

$$P = \frac{(I_{11})_V - G(I_1)_V}{(I_{11})_V + G(I_1)_V}$$

$$\text{ここで } G = \frac{(I_{11})_H}{(I_1)_H}$$

式中11は放射偏光子が垂直に平行であり、1は放射偏光子が垂直に直角であることを示している。

うな場合、散乱光の効果は微粉末、粒子および光を除去する試料前処理過程を用いることによりおよび適当な実験用対照標準 (experimental controls) を使用することにより最小にできる。

本発明の検定は既知の濃度の標的核酸の溶液を用いて作製される標準曲線を参照して定量化されることが理解されよう。

偏光蛍光光度計は自動化または半自動化液体および/またはカートリッジ取扱い装置を持つ検定機器の一部を形成してもよい。本発明の検定キットは自動化または半自動化検定機器上で行なわれる試薬および/またはカートリッジを含んでいる。そのような機器化は試料DNAのごとき試料核酸の例えばPCR技術による最初の増幅も提供し、従って加熱制御ブロックおよび/または自動化液体移送を含んでいるであろう。

本発明はまた上に定義した本発明の任意の態様に使用するための検定キットも含んでいる。検定キットは (用いられる特定の実施態様に依存して) 前に定義したごときプローブまたはプローブブラ

イマーおよび／または相補的ポリヌクレオチドの溶液で都合よく緩衝化されており、および随意に前記のごとくDNAの前処理のための他の溶液も一緒であり、および必要とされる動力学、親和性および特異性でハイブリダイゼーションを可能にするための緩衝液を含んでいる。そのような条件は検定温度に依存するであろうし、都合よく実験する事により決定される。本キットはまた特許請求された方法を実施するための適切な指導書も含んでいる。

本発明はこれらから例示されるが以下の実施例および図によって限定されるものではない。

第1図は標的部位：ブローブ分子の比に対する6.4 mer (T) および8 mer (P) の蛍光偏光のグラフを示している。

第2図は蛍光プローブを用いるPCR生成物の検定における温度の効果を示している。PCR生成物はオリゴヌクレオチド4および5をプライマーとして用いて発生された。

第3図は螢光プローブを用い、オリゴヌクレオ

合成機上（アブライドバイオシステムス 380B）  
製造者により推薦されているプロトコルを用い  
て合成された。濃アンモニア中で脱保護した後、  
濃縮器（セイバントスピードバク）中で蒸発乾固  
し、1.0 ml の水に再溶解する。

オリゴヌクレオチド1

LGCGTTTAG-3' ヒト $\alpha_1$  抗-トリプシン遺伝子の7552-7559塩基

オリゴヌクレオチド2

5'-CTAAACGCCTAAACGCCTAAACGCCTA  
AACGCCTAAACGCCTAAACGCCTAAACGC  
-3'

オリゴヌクレオチド1に相補的な8反復(repeat)を含む合成の4 meV

オリゴヌクレオチド3

5'-AATTCGCTTAAGATTTTGGCTGATTCCA  
TTAACAGTAAGTAATTTACACCTTACGAGGC  
CACTCG

相関がない 65 mer

オリゴヌクレオチド 4

チド4および5をプライマーとして用いるPCR生成物および相関しない配列の検定における塩濃度の効果を示している。

## 材料および方法

略 語

以下の略語が適用される：

S M C C スクシンイミジル・4-(N-マレ  
イミドメチル)シクロヘキサノ-1  
-カルボン酸

トリス      トリス(ヒドロキシメチル)アミノ  
メタン

BSA ウシ血清アルブミン

PBS 0.13 M NaCl . 5.4 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  .  
1.6 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  緩衝液 pH 7.3

SSC 20×SSCは3M NaCl, 0.3M  
クエン酸三ナトリウム

D M F ジメチルホルムアミド

F I T C フルオレセインイソチオシアナート.

## 1. オリゴヌクレオチド合成

以下のオリゴデオキシリボヌクレオチドがDNA

5' -TGCCACCGCCATCTTCTTCCTGCCTG  
ATGA-3'

PCRプライマー：ヒト $\alpha_1$  抗トリプシン遺伝子の7627-7656の塩基

オリゴヌクレオチド5

5' -TGGTGATGATATCGTGGGTGAGTTCA  
TTTT-3'

PCRプライマー：ヒト $\alpha_1$ 抗トリブシン遺伝子の7677-7706に相補的な塩基

オリゴヌクレオチド6

LGGAAACTACAGCACCT-3'

ヒト  $\alpha_1$  抗トリブシン遺伝子の7659-7674  
の塩基

オリゴヌクレオチド7

5' -CCCACCTTCCCTCTCTCCAGGCAA  
TGGG-3'

PCRプライマー：ヒト $\alpha_1$ 抗トリブシン遺伝子の7440-7469の塩基

オリゴヌクレオチド 8

5'-GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAG

GTG-3'

PCRプライマー：ヒト $\alpha_1$ 抗トリブシン遺伝子の7770-7799に相補的な塩基

オリゴヌクレオチド9

5'-GGAATCACCTTCTGTCTTCATTTTCC  
TGATGATATCGTGGGTGAGTTTATTTTCC

AGGAACTTGG  
AGGTGCTGTAGTTTCCCTCATCAGGCAG

GAA-3'

97-mer模範的オリゴヌクレオチド、ヒト $\alpha_1$ 抗トリブシン遺伝子7643-7739に相補的な塩基

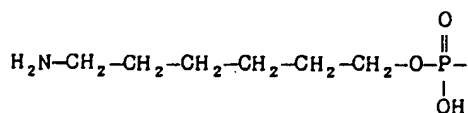
オリゴヌクレオチド10

5'-GGCGGGAAGGGGCGACTGCCGCCAAAA  
CACAATCATCAGCTCGATAAGGGTAAAGC

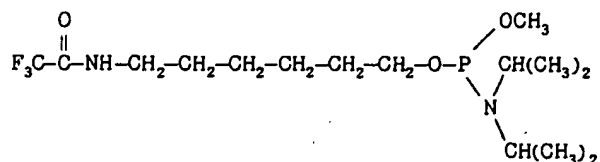
TGCCGACGATGGCGAT  
CTTTTGAAGGGTATTCAT-3'

90-mer模範的オリゴヌクレオチド、淋菌のピリンE (Pilin E) 遺伝子の725-824の塩基

上記の表においてヒトアルファ-1抗トリブシン遺伝子中の塩基は Long G.L. ら、バイオケミストリー (Biochemistry) . 1984 . 23 . 4828-4837 で使用されているごとくである。文字 A G C および T は塩基アデニン、グアニン、シトシンおよびチミンを各々示し、一方文字 L は次式のアミノリンカー基を示す：



これは次式の試薬から



自動化合成機上、ヌクレオチド要素の添加と同一のプロトコルを用い、5'末端水酸基との反応により誘導される。保護トリフルオロアセチル基は推奨されている過アンモニア脱保護工程の間に除去される。

基と相補的

オリゴヌクレオチド11

LTCGAGCTGATGATTGT-3'

淋菌のピリンE遺伝子の767-782の塩基

オリゴヌクレオチド12

LTTCCTGCCTGATGAG-3'

$\alpha_1$ -抗トリブシン遺伝子の7643-7657の塩基

オリゴヌクレオチド13

LGAAAATGAACTCACC-3'

$\alpha_1$ -抗トリブシン遺伝子の7676-7690の塩基

オリゴヌクレオチド14

LACGATATCATCACCA-3'

$\alpha_1$ -抗トリブシン遺伝子の7692-7706の塩基

オリゴヌクレオチド15

LGGTGAGTTCATTTTC-3'

オリゴヌクレオチド13と相補的

## 2. 5' (アミノヘキシルホスホリル) オリゴヌクレオチドのフルオレセイン化 (FL-オリゴ)

方法A：

約30ナノモルの5' (アミノヘキシルホスホリル) オリゴヌクレオチドを0.2 mlの水で希釈し、0.5%トリエチルアミンで平衡化したNAP-10セファデックスG-25Mゲル透過カラム (ファルマシア (Pharmacia)) で脱塩すると0.7 mlの脱塩生成物を得る。これに4 mg/mlのフルオレセイニンソチオシアナート (異性体1, シグマ, 0.3 ml) のメタノール溶液を添加し、55℃の水浴中1時間反応を進行させる。溶液は次に20  $\mu$ lの1 M トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン pH 7.5 を添加することにより中和し、10 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、1 mM EDTA, pH 8.0 で平衡化したセファデックスG 25 M PD-10カラム (ファルマシア) にかける。脱塩生成物、1.6 mlを濃縮器中 (セイバントスピードバク (Savant Speedvac)) で約0.4 mlの容量まで濃縮する。精製はウォーターズC18



マイクロボンダパック ( Waters C18 micro Bondapak ) カラム上 LKB hplc 装置の吸収検出器を 495 nm にセットする逆相 hplc により達成される。カラムを溶出液 A ( 0.1 M トリエチルアンモニウム酢酸 pH 7.0 ) で 1.0 ml/min の流速で平衡化し、試料注入後溶出液 B ( 100 % アセトニトリル ) の 0 から 60 % 直線濃度勾配を 60 分にわたって行う。フルオレセインによる 495 nm の吸収を示す分画を集め、分光器で分析する。260 nm および 495 nm の光学密度から約 0.7 から 0.8 モル/モル DNA のフルオレセイン含量が計算された。

#### 方法 B :

アミノ誘導化オリゴヌクレオチドの水溶液 (120  $\mu$ l) に 1 M 炭酸/炭酸水素ナトリウム緩衝液 pH 9.0 (60  $\mu$ l) 続いて FITC の 1 % 乾燥 DMF 溶液 (20  $\mu$ l) を加える。室温 (25  $^{\circ}$ C) 暗所にて 3 時間放置して反応を進行させ、その後 PBS で平衡化した NAP-5 ゲル透過カラム (ファルマシマ) を通して脱塩し、脱塩分画 (0.8

性させ、放置して室温まで冷却する。2 単位の下ルムスアクトカス ( *Thermus aquaticus* ) DNA ポリメラーゼ (ニューイングランドバイオラボまたはセタス ( New England Biolabs or Cetus )) が各々の管に添加され、その後 50  $\mu$ l の亜鉛油 (シグマ ( Sigma )) が層積される。

DNA 増幅は下記の条件で (特に記載しないかぎり) テクネインテリジェント加熱ブロック ( Techne intelligent heating block ) またはパーキン-エルマーセタス DNA 熱サイクラー ( Perkin-Elmer Cetus DNA thermal cycler ) 上、ポリメラーゼ増幅法を用いて実施された :

セグメント 1	温度 91 $^{\circ}$ C	時間 2 分
セグメント 2	温度 60 $^{\circ}$ C	時間 3 分
セグメント 3	温度 72 $^{\circ}$ C	時間 2 分
サイクル数 = 36		

実施例 6 から 9 で適用された増幅で用いられたのは :

セグメント 1	温度 94 $^{\circ}$ C	時間 2 分
---------	--------------------	--------

ml) を取る。これは本質的に上記のごとく、ただし溶出液 B は 80 % アセトニトリル/水で 45 分の勾配により hplc にて精製される。

#### 3. ポリメラーゼ増幅反応

反応は以下のものを含み、オートクレーブをかけられた 0.5 ml 微量遠心管 (アルファラボラトリーズ ( Alpha Laboratories )) 中で実施された :

0.025 から 1  $\mu$ g のヒトゲノム DNA  
10  $\mu$ l 100 mM トリス HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % セラチン (w/v) pH 8.3

6  $\mu$ l dNTPs ( 3.33 mM dATP, 3.33 mM dGTP, 3.33 mM dTTP )

100 ピコモルの 3' プライマー

2 またはそれ以上のピコモルの 5' プライマー  
水で 100  $\mu$ l とする (ミリポアリジェントグレードウォーターシステム (Millipore Reagent Grade Water System) )

これらの管を 5 分間煮沸してゲノム DNA を変

セグメント 2	温度 60 $^{\circ}$ C	時間 2 分
セグメント 3	温度 70 $^{\circ}$ C	時間 0.5 分
サイクル数 = 45		

#### 4. 偏光測定

偏光は、励起および放射光光路上に位置し、0 $^{\circ}$  または 90 $^{\circ}$  に設定できる偏光フィルターが提供される製造元の偏光アクセサリが装備されたパーキンエルマー LS-5 B 蛍光光度計 ( Perkin Elmer LS-5 B fluorimeter ) を用い測定された。

使用された波長の設定は :

励起 (nm)	放射 (nm)
---------	---------

フルオレセインに関しては :	495	520
----------------	-----	-----

ローダミンに関しては :	544	576
--------------	-----	-----

試料の蛍光は約 2.0 ml のヒューズおよびヒューズ使い捨てキューベット中、または 0.55 ml のパーキンエルマー 5200, 4339 中 (実施例 6 から 9) 4 つの組合せのフィルター設定で測定された :

	励起フィルター	放射フィルター
$(I_1)_V$	垂直	水平
$(I_{11})_V$	垂直	垂直
$(I_1)_H$	水平	水平
$(I_{11})_H$	水平	垂直

補正因子Gは次式から計算された:

$$G = \frac{(I_{11})_H}{(I_{11})_V}$$

偏光値は次式から計算された:

$$P = \frac{(I_{11})_V - G(I_1)_V}{(I_{11})_V + G(I_1)_V}$$

引用されたすべての値は少くとも2回の繰返し  
の平均である。すべての測定は特に指示しない限り  
室温で行われた。

#### 5. ローダミンによるオリゴヌクレオチドの標識

これはセクション2のフルオレセイン化法 (fluoresceinylation) (方法B) を用い、フル  
オレセインインテオシアナートの代わりに1%ロ  
ーダミンBインテオシアナート(シグマ(Sigma))  
を使用して実施された。

0.15 mlの緩衝液のみの2つの対照実験を行う。  
反応液を1.2 mlのPBSで希釈し、分光光度中  
412 nmでゼロに合わせ、25  $\mu$ lの1 mM  
5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)を添  
加する。残存するチオール濃度を14150の吸  
光係数を用いて測定し、試料および対照間の差か  
らマレイミド濃度およびここから置換の程度が計  
算される。この値はタンパク質1モル当り1.7モ  
ルのマレイミドである事が観察された。

#### 6.2 5'-アミノ誘導化オリゴヌクレオチドと 2-イミノチオランの反応および続いてのBSA による抱合

アミノ誘導化オリゴヌクレオチド(公称1  $\mu$   
モル合成の%)の水溶液(0.2 ml)に新しく調製  
した2-イミノチオラン(5 mg/ml)の0.2 M重  
炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0)溶液(0.3 ml)  
を添加し、反応液を37℃にて30分間インキュ  
ベートする。生成物はPBSで平衡化したNAP  
25脱塩カラム(ファルマシア)を通すことによ  
り単離され、生成物を1.6 mlに集める。これは直

#### 6. BSAオリゴヌクレオチド1:3抱合体の合成

##### 6.1. マレイミド誘導化BSAの調製

BSAの溶液に(シグマ, 10 mg/ml 100  
 $\mu$ l PBS/100  $\mu$ l 水中), 0.1 Mトリエタノー  
ルアミンHCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>,  
pH 7.4 (0.6 ml), 続いて12  $\mu$ lの新しく調  
製したSMCC(ピアス(Pierce))の乾燥DMF  
溶液(6.7 mg/ml)を加え、反応混合物は25℃  
にて30分間インキュベートする。生成物は前もつ  
てBSA(ベーリンガー・モレキュラー・バイオ  
ロジー・グレード(Boehringer molecular  
biology grade))を飽和させ、PBSで平衡  
化されているNAP25脱塩カラム(ファルマシ  
ア(Pharmacia))を通して精製される。生成物  
は1.6 mlに集められ一部を分析のために取る。タ  
ンパク質濃度は280 nmでのODで評価され  
(1 mg/mlに対し0.62の吸光係数を用い)一方  
マレイミド濃度は以下のごとく評価された: 0.15  
mlの試料を10  $\mu$ lの1 mMメルカプトエタノー  
ルと30分間37℃で反応させ、それと相並んで

ちに前記のごとく調製したBSAに加える。2つ  
の成分は4℃にて一夜放置して反応させる。

反応液はBSA阻止マイクロ濃縮器(アミコン  
(Amicon))を用いて約0.5 mlまで濃縮し、  
50 mMトリス緩衝液(pH 7.5)で平衡化され  
0.14 ml/minの流速で溶出されるバイオゲルP  
-100 F(バイオラド(Biorad))のカラム  
(約45 ml)にかける。溶出ピークは260 nm  
でのUV吸収により検出され、抱合体を含む第1  
のピークの分画のUVスペクトルが決定された。  
260および280 nmの両方を含む分画をブー  
ルする。280 nmの寄与が増加した分画(遊離  
BSAによると考えられる)は排除する。

##### 実施例 1

##### フルオレセイン化8-merの合成と4-merオリ ゴヌクレオチド標的へのハイブリダイゼーション

10 mMトリス, 1 mM EDTA pH 8.2 (2.0  
ml)および3 M NaCl, 0.34 Mクエン酸三ナト  
リウム(0.3 ml)に溶解したFL-オリゴ1の  
10<sup>-7</sup> M溶液(2.0 ml)を調製し偏光値を測定し

た。キューベットに表に示したごとく10 mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、1 mM EDTA pH 8.0に溶解した $10^{-4}$  M、 $10^{-5}$  M または $10^{-6}$  Mの一連の64-mer 標的(オリゴ2)を添加し、各々の添加後の偏光値を測定した。これらのデータは下記の表および第1図に示されており、標的の存在により偏光値が増加することを示している。

添加された容積( $\mu$ L)			標的8-mer 部位のプローブに対する累積比	偏 光
$10^{-6}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-4}$ M		
—	—	—	—	0.075
12.5	—	—	0.5	0.078
25	—	—	1.5	0.084
—	5.0	—	3.5	0.098
—	10.2	—	7.5	0.111
—	20.5	—	15.5	0.123
—	—	4.1	31.3	0.128
—	—	8.2	63.5	0.135
—	—	16.4	127.5	0.139

100ピコモルのオリゴ4および3'プライマーとして100ピコモルのオリゴ5を用いて前記のごとく実施された。

2 mlの10 mM トリスHCl、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM 塩化マグネシウム、0.01%ゼラチン(w/v) pH 8.3溶液中の5.1ピコモルのFL-オリゴ6の発光の偏光を測定した。PCR生成物(10.0  $\mu$ L)は5分間煮沸した後氷上で5分間冷却する。この液をキューベット中のプローブに加え、混合し、10分後に再び発光の偏光を測定した。

結 果	偏 光
フルオレセイン化 オリゴ6 単独	0.084
フルオレセイン化 オリゴ6+PCR生成物	0.155

PCR生成物の存在は偏光値の有意な増加を起こした。

#### 実施例 3

##### 一本鎖PCR生成物の検出

ポリメラーゼ増幅反応は前記のごとく実施された。5'プライマーは2ピコモルのオリゴ7であり、

相互作用の特異性が相関のないオリゴヌクレオチド(オリゴ3)を標的として用いて研究された。10 mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、1 mM EDTA pH 8.0 (2.0 ml)および3 M NaCl、0.3 M クエン酸三ナトリウム(0.1 ml)に溶解したFL-オリゴ1の $10^{-7}$  溶液を調製し、偏光値を測定した。キューベットに $5 \times 10^{-7}$  M 濃度のオリゴ2を添加し偏光値を測定した。これを同一濃度のオリゴ3を用いて繰り返した。結果は下記の表のごとくであった。

	偏 光	標準偏差(n=4)
FL-オリゴ1単独	0.0636	0.0015
FL-オリゴ1+オリゴ2	0.1091	0.0022
FL-オリゴ1+オリゴ3	0.0617	0.0019

プローブおよび非相関標的から得られる偏光値はプローブ単独で得られる値と有意には異っておらず、オリゴ2の特異性を示した。

#### 実施例 2

##### PCR生成物の検出

ポリメラーゼ増幅反応は5'プライマーとして

3'プライマーは100ピコモルのオリゴヌクレオチド8であった。40サイクル実施した。

2 mlの10 mM トリスHCl、50 mM 塩化カリウム、1.5 mM の塩化マグネシウム、0.01%ゼラチンpH 8.3に溶解した5.1ピコモルのFL-オリゴ6の発光の偏光を測定した。PCR生成物(10.0  $\mu$ L)をキューベットに加え混合した。室温で10分後に発光の偏光を測定した。

結 果	偏 光
フルオレセイン化 プローブ	0.082
フルオレセイン化 プローブ+PCR生成物	0.148

PCR生成物の存在は偏光値に有意な増加を起こした。

#### 実施例 4

##### 一本鎖PCR生成物の検出

ポリメラーゼ増幅反応は前記のごとく実施された。5'プライマーは2ピコモルのオリゴ4であり、3'プライマーは100ピコモルのオリゴヌクレオチド5であった。

2 mlの10 mM トリスHCl、50 mM 塩化カリ

ウム、1.5 mM塩化マグネシウム、0.01%ゼラチン pH 8.3 に溶解した5.1 ピコモルフレーオリゴ6の発光の偏光を測定した。PCR生成物(100  $\mu$ l)がキュベットに加えて混合した。室温で10分後発光の偏光を測定した。

結 果	偏 光
フルオレセイン化プローブ	0.084
フルオレセイン化プローブ+PCR生成物	0.160

PCR生成物の存在は偏光値に有意な増加を起した。

#### 実施例 5

##### 伸長生成物の検出

ポリメラーゼ増殖反応は前に記載したごとく、ただし次のプログラムで実施された：

セグメント 1	温度94℃	時間 2分
セグメント 2	温度55℃	時間 15分
セグメント 3	温度72℃	時間 1分

5'プライマーは2ピコモルのフルオレセイン化オリゴヌクレオチド6であった。3'プライマーは100ピコモルのオリゴヌクレオチド5であった。

補的なローダミン標識オリゴR(RH-オリゴ11)を用いて別々におよび一緒に検出された。

標的Aおよび/またはBの存在下および不存在下プローブFおよびR混合物(各々4ピコモル)の発光の偏光を0.45 M NaCl、0.05 M クエン酸三ナトリウム、10 mM トリス(ヒドロキシメチル)(アミノエタン pH 8.0 (0.55 ml)中で測定した。

	偏光(カッコ内は標準偏差)	
プローブ:	F	R
標的無	0.088(0.003)	0.243(0.004)
標的A	0.184(0.006)	0.253(0.009)
標的B	0.087(0.005)	0.311(0.002)
標的AおよびB	0.193(0.005)	0.316(0.009)

標的A存在下では対応するプローブFが偏光の増加を示しており、同様にRの偏光は標的Bの存在下増加している。両方のプローブとも2つの標的が一緒に存在している場合増加した偏光値を示した。このことは2つの異ったDNA配列の存在または不存在が同一のキュベット中で独立して測

2 mlの10 mM トリスHCl、50 mM塩化カリウム、1.5 mMの塩化マグネシウム、0.01%ゼラチン pH 8.3 に溶解した5.1 ピコモルフレーオリゴ6の発光の偏光を測定した。

2 mlの10 mM トリスHCl、50 mM塩化カリウム、1.5 mM塩化マグネシウム、0.01%ゼラチン pH 8.3 に加えた100  $\mu$ lのPCR生成物の発光の偏光も同様に測定した。

結 果	偏 光
フルオレセイン化プライマー	0.080
PCR生成物	0.160

PCR生成物内へのプライマーの取り込みは偏光値の有意な増加を起した。

#### 実施例 6

##### 2つの異った発光発色団を用いた2つの配列の同時検出

2つの別々の合成標的A(オリゴ9, 97 mer)および合成標的B(オリゴ10, 90 mer)が標的Aの一部と相補的なフルオレセイン標識オリゴF(フルーオリゴ13)および標的Bの一部と相

定できることを示している。

#### 実施例 7

##### 3つのフルオレセイン標識オリゴヌクレオチドを用いるPCR生成物の検出

オリゴ7(1ピコモル)およびオリゴ8(100ピコモル)をプライマーとして用いるPCR(45サイクル)によりヒトDNA(25 ng)が増幅された。3つのチューブを合併し、DNAをフェノール(セバグ溶液、100  $\mu$ l)で処理し、激しく攪拌し、13,000 rpmで2分遠心分離した。フェノール層を除去した後溶液はエーテルで3回抽出した。3 M酢酸ナトリウム(38.5  $\mu$ l)続いてエタノール(1 ml)を添加した。-70°Cにて15分間に冷却後チューブを上記のごとく遠心し、ペレットを3×SSC、50 mM トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、pH 8.0(500  $\mu$ l)に再溶解した。

フルオレセイン化オリゴ12, 13および14(各々3ピコモル)を3×SSC、50 mM トリス、pH 8.0(0.550 ml)に加え、発光偏光を測

定した(別々におよび混合物として)。上記PCR生成物(500 $\mu$ l)の存在下、(50℃で30分インキュベートし、室温まで冷却)、測定を繰り返した。

#### 結果

	偏光(SD, n=5)	蛍光 $v/v^*$
EL-オリゴ 12 単独	0.096(0.004)	716
FL-オリゴ 13 単独	0.103(0.008)	524
FL-オリゴ 14 単独	0.091(0.009)	553
FL-オリゴ 12, 13 および14	0.073(0.010)	1772
FL-オリゴ 12, 13 および14	0.137(0.004)	1600

+ 相関PCR生成物

\* 両方の偏光フィルターは垂直に配列されている  
(単位は任意である)

3つのプローブの混合物は標的の存在下高い偏光を与えることが観察された。プローブ混合物で得られたより高い蛍光の読み値は読み値のより良い精度および確かさを与え、および/または付随する感度の改良によりより低いプローブ濃度での

もたらされる偏光の増加を有意に促進したことが観察できる。

#### 実施例 9

相補DNA鎖に対する相対的プローブとの拮抗によるオリゴヌクレオチド標識の検定

0.45M NaCl, 0.05M クエン酸三ナトリウム, 10mM トリス pH 8.0 (0.55ml) 中 BSA 抱合オリゴヌクレオチド (7ピコモル) を種々の濃度の合成標的オリゴ9と混合し、その溶液に蛍光標識オリゴ15 (3ピコモル) (BSAオリゴ抱合体と相補的) を添加した。

#### 結果

標的の量 (ピコモル)	蛍光偏光	標準偏差 (n=3)
0	0.121	0.005
1	0.116	0.002
2	0.098	0.004
3	0.096	0.008
6	0.092	0.003
プローブ1533 単独	0.084	0.008

使用を可能にする。

#### 実施例 8

ウシ血清アルブミン (BSA) 抱合体プローブを用いたハイブリダイゼーションにおける偏光増加の促進

8ピコモルの合成標識オリゴ9の存在下または不存在下、3×SSC, 50mM トリス, pH 8.0 (0.5ml) にフルオレセイン標識オリゴ14 (3ピコモル) を加え、偏光値を測定した。この溶液にBSAオリゴ13抱合体 (27ピコモル) を加え、室温で10分間インキュベーション後、再び偏光値を測定した。

#### 結果

	偏光(SD)(n=5)
FL-オリゴ 14 単独	0.091(0.009)
FL-オリゴ 14 + 標的	0.164(0.004)
FL-オリゴ 14 + BSA/オリゴ13	0.094(0.007)
FL-オリゴ 14 + 標的 + BSA/オリゴ13	0.189(0.004)

相補的BSAオリゴ抱合体の存在は標的への蛍光標識プローブのハイブリダイゼーションにより

標的濃度を増加するにつれ蛍光偏光の果進的減少が観察でき、それ故本検定は試料中の標的DNAの濃度の算定に使用されるであろう。

#### 実施例 10

蛍光プローブによるPCR生成物の検定:

#### 温度の影響

a) 1×SSC (2ml), b) FL-オリゴ6 (5.1ピコモル) を含む1×SSC (2ml) および c) FL-オリゴ6 (5.1ピコモル) およびオリゴ7 (2ピコモル) およびオリゴ5 (100ピコモル) をプライマーとして用いる標準PCR条件下プライマーにより発生される相補的非対称PCR生成物 (約7ピコモル) を含む1×SSC (2ml) を含む3つのキュベットを蛍光光度計のサーモスタットセルホルダーに置いた。熱電対装置はキュベットa) に置いた。

キュベットb) およびc) の蛍光偏光を室温(22℃)で測定し、セルホルダーを通る循環水の温度を段階で増加させてある範囲の試料温度を与える。各々の点で温度を安定に5分間保ち、その時の偏

光を測定した。

#### 結 果

結果は第2図にプロットしてある。プローブ単独では温度の増加に伴ったタンブリング(tumbling)の増加による偏光の一般的に予想される減少がある。ハイブリッドのより高い偏光は約50℃まで保持され、その点で多分ハイブリッドの融解のため偏光は遊離プローブの偏光まで戻る。

#### 実施例 11

発光プローブを用いるPCR生成物の検出：

#### 塩濃度の影響

水(2 ml)中に：a) 5.1 ピコモルのF L-オリゴ6、b) 5.1 ピコモルのF L-オリゴ6および6 ピコモルの実施例10で使用された相補PCR生成物およびc) 5.1 ピコモルのF L-オリゴ6および大過剰(1.4 ナノモル)の非相関50-merオリゴヌクレオチドを含む3つのキュベットを準備した。塩濃度は20×SSCの一部を添加することにより増加させ、5×SSCまでの最終濃度の濃度範囲を与え、各々の添加後の発光偏光を測

定した。

#### 結 果

結果は第3図に示してある。少くとも一部は溶液の粘度の増加による塩濃度に伴う偏光の全体の増加がある。0.5×SSC以上では標的DNAへのプローブの結合による偏光の明らかな促進は明白であり、この促進は大過剰の非標的を含むキュベット中では起こらない。

#### 4. [ 図面の簡単な説明 ]

第1図は、標的部位：プローブ分子の比に対する64 mer (T) および8 mer (P) の発光偏光を示すグラフである。

第2図は、発光プローブを用いるPCR生成物の検定に及ぼす温度の影響を示すグラフである。

第3図は、発光プローブを用い、プライマーとしてオリゴヌクレオチド4および5を用いるPCR生成物並びに相関しない配列の検定に及ぼす塩の濃度の影響を示すグラフである。

代理人 弁理士 湯 淺 恭



( 外 4 名 )

図面の浄書(内容に変更なし)

Fig. 1.

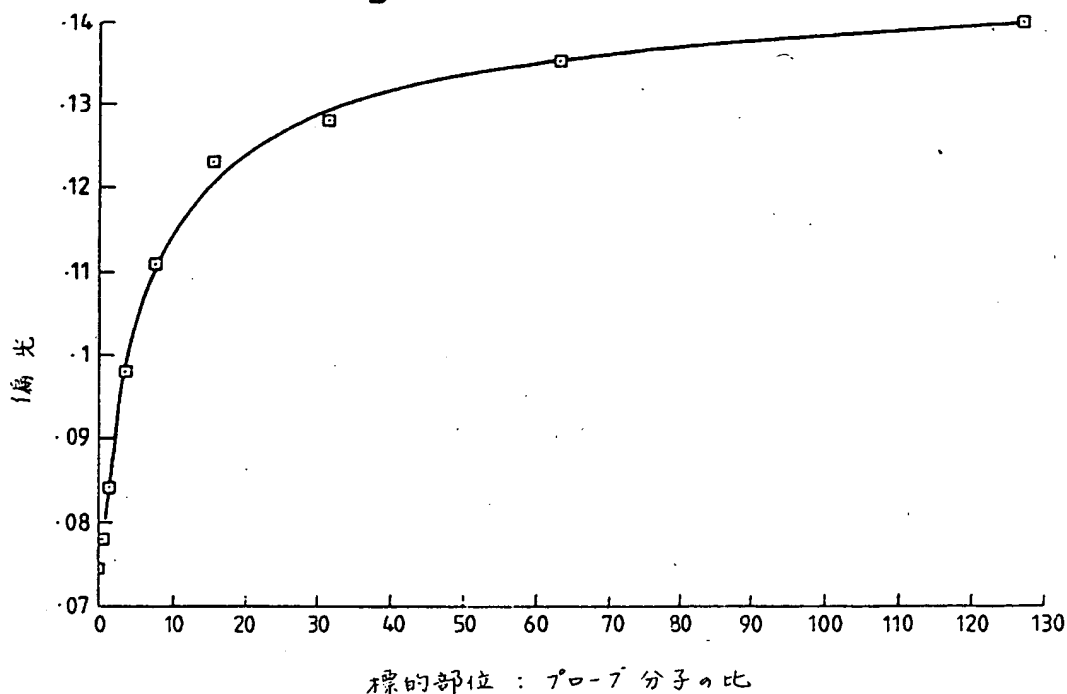


Fig. 2.

偏光対温度

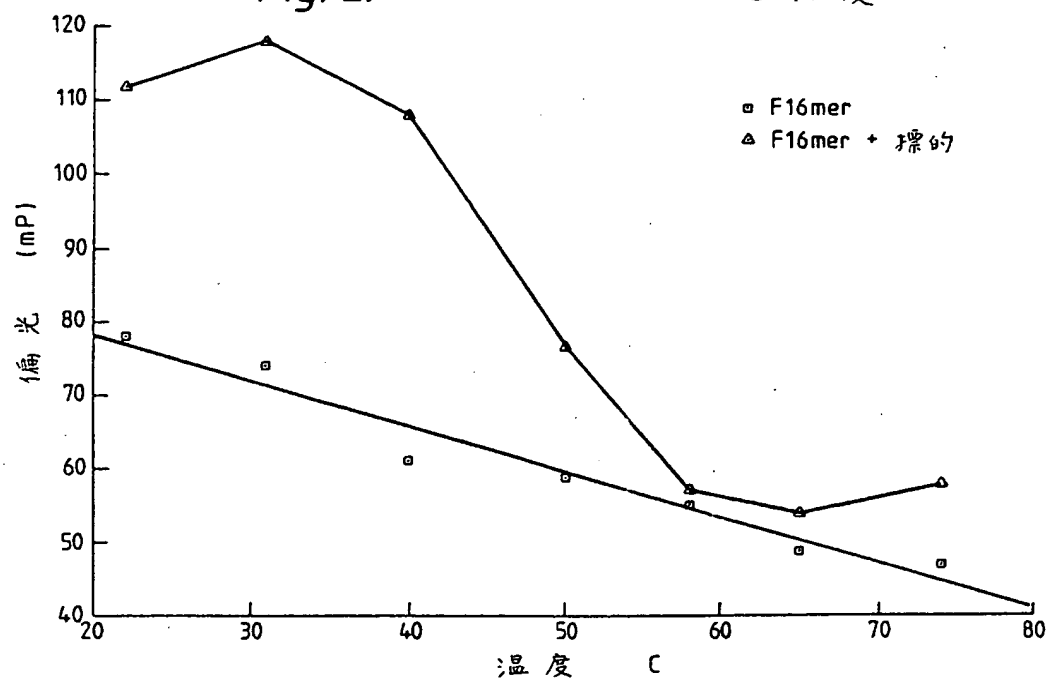
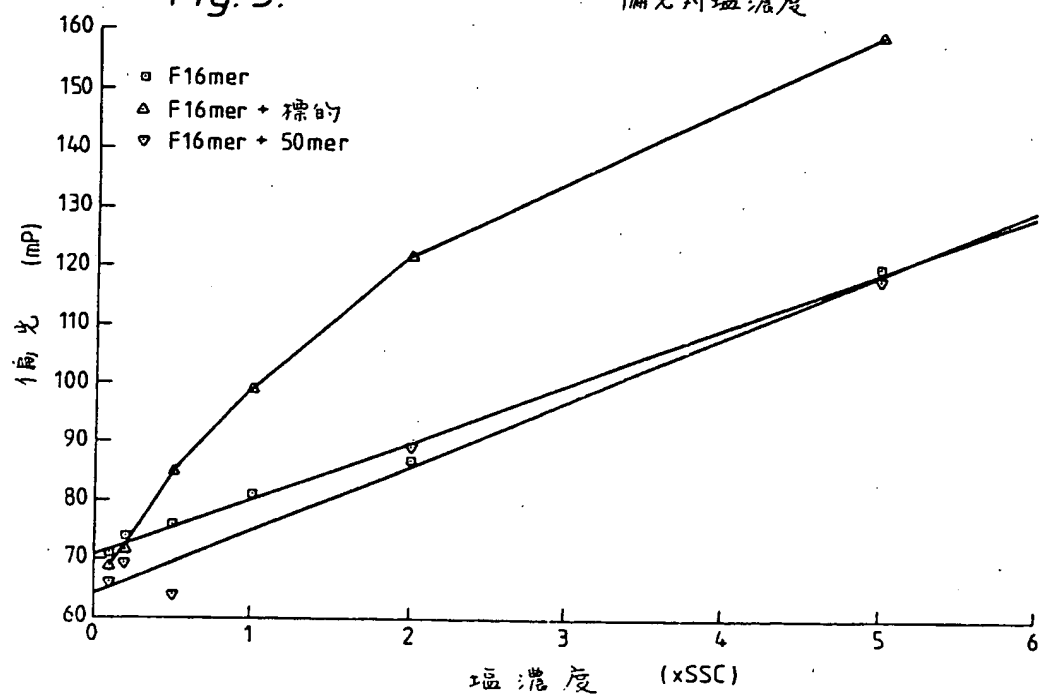


Fig. 3.

偏光対塩濃度



手続補正書(方式)

平成 2年 6月 / 日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿



1. 事件の表示

平成2年特許第28127号

2. 発明の名称

検定方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

名 称 インベリアル・ケミカル・インダストリーズ・  
ピーエルシー

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル 206区

電 話 270-6641~6646

氏 名 (2770) 弁理士 湯 浅 恭 三



5. 補正命令の日付 平成 2年 5月29日 (発送日)

6. 補正の対象

適正な図面

7. 補正の内容

別紙の通り(尚、図面の内容には変更なし)

方式  
審査

